



TITLE:

Cytokeratin-19 RT-PCR法を用いた 腎細胞癌患者血液中の癌細胞検出

AUTHOR(S):

日置, 琢一; 杉村, 芳樹

CITATION:

日置, 琢一 ...[et al]. Cytokeratin-19 RT-PCR法を用いた腎細胞癌患者血液中の癌細胞検出. 泌尿器科紀要 1999, 45(8): 577-581

ISSUE DATE:

1999-08

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/114095>

RIGHT:

Cytokeratin-19 RT-PCR 法を用いた腎細胞癌患者 血液中の癌細胞検出

愛知県がんセンター泌尿器科 (部長 : 杉村芳樹)

日置 琢一, 杉村 芳樹

DETECTION OF CIRCULATING CANCER CELLS BY NESTED REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION OF CYTOKERATIN-19 IN PATIENTS WITH RENAL CELL CARCINOMA

Takuichi HIOKI and Yoshiki SUGIMURA

From the Department of Urology, Aichi Cancer Center

Detection of circulating cancer cells in peripheral blood may improve cancer staging and monitoring. This study was undertaken to investigate the clinical implications of detection of circulating cancer cells in renal cancer patients.

Cytokeratin-19 (CK19) mRNA was amplified by nested reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood of 33 healthy volunteers and 19 patients with renal cell carcinoma. The detection limit of the method was 10 cancer cells in 10^7 peripheral blood mononuclear cells. The positive detection rate was 47% for renal cancer patients and 9% for healthy volunteers. The number of patients expressing CK19 mRNA in each clinical stage was 0 out of 3 patients in stage 1; 2 out of 8 (25%) in stage 2; 3 out of 4 (75%) in stage 3; 4 out of 4 (100%) in stage 4. A significant correlation was seen between CK19 mRNA expression and clinical stage ($p=0.0023$).

This method may be useful for early detection of micrometastasis, and facilitate the design of better therapeutic strategies for the treatment of renal cancer patients.

(Acta Urol. Jpn. 45 : 577-581, 1999)

Key words : Renal cell carcinoma, Cytokeratin, Micrometastasis, RT-PCR, Circulating cancer cell

緒 言

腎細胞癌にとって手術による癌組織の摘出は最も有効な治療法と考えられるが、術後に転移再発を経験することは多い。この転移再発は手術時に既に散布されている遊離癌細胞や微小転移巣によると考えられ、画像診断法などの手段ではこれらを術前に診断することは困難である。近年の分子生物学的手法の発展は、転移巣の成立に至る多段階からある一段階において重要な働きをする特定の分子を明らかにしてきたが、必ずしも臨床的な転移出現とは一致せずその評価を困難にしている。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法では微量の標的 mRNA の検出が可能であり、血液中の癌細胞の存在自体を検出することが可能となってきた¹⁻³⁾。本研究では nested primer RT-PCR 法を用い、腎細胞癌患者の血液中より上皮細胞に特異性の高い cytokeratin-19 (CK19) の mRNA を検出することを試みて、臨床応用への可能性を検討した。

対 象 と 方 法

(1) 培養細胞と健常者、腎細胞癌患者からの検体
測定法の基礎的検討のため、10% FCS 加 RPMI 1640 で培養したヒト腎細胞癌培養細胞 OSRC-2 を用いた。この培養細胞は CK19 免疫組織染色にて陽性であった。健常者の末梢血単核細胞 1×10^7 個に対して OSRC-2 培養細胞を 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 0 個混ぜた段階希釈検体を用い、CK19 RT-PCR 法の測定感度を検討した。

臨床的検討の対象は、健常成人ボランティア33例と1995年から1997年に愛知県がんセンターで治療を行った腎細胞癌患者19例であった。被験者には研究目的、検体採取に対する十分な説明を行い、文書による承諾を得た。腎細胞癌患者の臨床的背景は Table 1 に示すごとくで、臨床病期、組織学的異型度、T分類、M分類、V分類は腎癌取り扱い規約⁴⁾にしたがった。健常成人では末梢血採血を行い、腎細胞癌患者では全例から腎摘出術前の末梢血採血と16例から手術中に腎静脈血採血を施行した。また19例の摘出腎から腎細胞癌組

Table 1. Patients' characteristics

Total No. Pts.		19
Mean age, years (range)		59 (42-79)
Sex	Male	15
	Female	4
Clinical stage	Stage 1	3
	Stage 2	8
	Stage 3	4
	Stage 4	4
Pathological grading	Grade 1	2
	Grade 2	16
	Grade 3	1
Histological subtype	Clear cell	11
	Granular cell	2
	Mixed	6
Blood samples	Peripheral blood	19
	Renal vein	16

組織を採取した。採血は、EDTA 加試験管に末梢血 4~12 ml, 腎静脈血 4 ml を採血した。末梢血採血は皮膚穿刺時の上皮細胞混入を避けるため、皮膚穿刺後 1, 2 管目の検体は測定に用いず、3 管目以後の検体を本測定に用いた。腎静脈血採血は腎摘出後の摘出腎静脈本幹から採取した。

(2) Total RNA 抽出

血液検体は 1,000×g 10 分間の遠心にて血漿を除去し、細胞成分に混入した赤血球は 0.2% NaCl の低張食塩水に浮遊して溶血させ再び遠心分離した。上清を除去し PBS にて洗浄後 750 μ l の ISOGEN-LS, RNA extraction buffer (Nippon Gene, Japan) に溶解して -80°C で保存した。凍結検体を溶解後 acid guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform 抽出法⁵⁾を用いて total RNA を抽出した。DNA 混入を除去するため RNase-free DNase 1 (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて total RNA を精製した。

(3) Nested primer RT-PCR

Total RNA を鋳型とした一本鎖 cDNA の作製は、5 μ g の total RNA に 50 ng の random hexanucleotide primers (Pharmacia Biotech, Sweden) を加えた 9 μ l の溶液を 70°C で 10 分反応し、氷上で冷却後、5×synthesis buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4 μ l, 100 mM DTT 2 μ l, 2.5 mM dNTP 4 μ l, 200 U Super-Script II reverse transcriptase (Gibco BRL, USA) 1 μ l を加え、37°C で 60 分、90°C で 10 分反応させ、-80°C で保存した。Total RNA 抽出の確認には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene⁶⁾ に対する RT-PCR 法を同時に行い、355 bp の特異バンドを検出した検体について以下の測定を行った。

Nested PCR に用いた CK19 に特異的な primer は Datta ら³⁾の報告にしたがい、outer primer として

primer A: 5'-AAGCTAACCATGCAGAACCTCA-ACGACCGC-3', primer B: 5'-TTATTGGCAGG-TCAGGAGAAGAGCC-3', nested primer として primer C: 5'-TCCCGCGACTACAGCCACTACT-ACACGACC-3', primer D: 5'-CGCGACTTGAT-GTCCATGAGCCGCTGGTAC-3' を合成した。1 回目の PCR 反応液は、total RNA 100 ng 相当量の cDNA 1 μ l と outer primer (primer A, B) 各 0.1 μ M に 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 U Taq DNA polymerase (Takara, Japan) を加え合計 10 μ l とし、mineral oil を重層した。PCR は thermocycler (MJ Research inc., USA) を用い、denaturation 94°C で 1 分、annealing 63°C で 1 分、polymerase extension 72°C で 2 分にて 35 cycle 施行した。2 回目の PCR は、1 回目の PCR 産物 1 μ l に nested primer (primer C, D) 各 0.1 μ M を用い、1 回目と同様の方法で 35 cycle 施行した。

(4) PCR 産物の確認

10 μ l の PCR 産物を 2% agarose gel 上で電気泳動し、ethidium bromide 染色を行った。745 bp の特異バンドを検出したものを陽性とした。一部の PCR 産物の塩基配列は dideoxy chain termination sequencing method⁷⁾を用いて確認した。

結 果

(1) 検出感度と腎細胞癌組織に対する特異性

ヒト腎細胞癌細胞株 OSRC-2 細胞を健常者末梢血にて段階希釈した検体を用いた検出感度検討では、末梢血単核細胞 1×10⁷ 個当たり OSRC-2 細胞 10 個で検出可能であった。摘出した原発腫瘍の腎細胞癌組織を検体として用いた組織特異性の検討では、19 例中 18 例、95% で CK19 mRNA が検出された。

(2) ヒト血液中での CK19 mRNA 発現 (Table 2)

健常人 33 例の末梢血中 3 例 (9%) に CK19 mRNA が検出された。腎細胞癌患者では 19 例中 9 例 (47%) の血液中に CK19 mRNA が検出された。検

Table 2. Correlation between CK19 expression, and normal controls and cancer patients

Sample source	No. pts.	No. CK19 mRNA (%)	
		Pos.	Neg.
Normal controls (peripheral blood)	33	3 (9)	30 (91)
Renal cell cancer patients* (peripheral blood)	19	9 (47)	10 (53)
(renal vein)	16	6 (32)	13 (68)
		4 (25)	12 (75)

* A sample from either peripheral blood or renal vein expressed CK19 was considered positive.

Table 3. Correlation between clinical stage and CK19 expression

Clinical stage	No. pts.	No. CK19 mRNA (%)	
		Pos.	Neg.
Stage 1	3	0 (0)	3 (100)
Stage 2	8	2 (25)	6 (75)
Stage 3	4	3 (75)	1 (25)
Stage 4	4	4 (100)	0 (0)

Table 4. Correlation between CK19 expression and clinicopathologic features

Variables		No. pts.	No. CK19 mRNA (%)	
			Pos.	Neg.
M factor	M0	15	5 (33)	10 (67)
	M1	4	4 (100)	0 (0)
V factor	V0	11	3 (27)	8 (73)
	V1, 2	8	6 (75)	2 (25)
Tumor size	≤70 mm	16	7 (44)	9 (56)
	>70 mm	3	2 (67)	1 (33)

体採取部位では, 末梢血で19例中6例 (32%), 腎静脈血で16例中4例 (25%) と差を認めなかった。

(3) 腎細胞癌臨床所見と血中 CK19 mRNA の関係
腎細胞癌取り扱い規約による臨床病期別にみると (Table 3), stage 1 で0%, stage 2 で25%, stage 3 で75%, stage 4 で100%の腎細胞癌患者に CK19 mRNA が検出され, 血中 CK19 mRNA 陽性例では陰性例より有意に臨床病期が高かった (Mann-Whitney 検定にて $p=0.0023$)。

血中 CK19 mRNA の検出と遠隔転移の有無の間には有意な関連が認められた (Fisher の直接確率計算法にて $p=0.033$) が, 静脈内進展や腫瘍径との関連は弱かった。M0 症例の33%, V0 症例の27%, 腫瘍径 70 mm 以下の症例の44%にも血中 CK19 mRNA が検出された (Table 4)。

(4) 血中 CK19 mRNA 発現と予後

経過観察期間が短く, 末だ予後との関係は不明である。現在のところ腎摘出術前に血中 CK19 mRNA が陽性であった9例 (経過観察期間11~40カ月, 平均25カ月) のうち2例が癌死, 1例が新転移出現の後に他因死, 1例が新転移出現にて生存中である。一方, 血中 CK19 mRNA が陰性であった10例 (経過観察期間21~40カ月, 平均30カ月) に再発, 転移の徴候は認めない。

考 察

最近, 癌遺伝子の変異や組織特異的な mRNA の発現に着目し, RT-PCR 法を用いて原発巣以外での微小癌細胞を検出する試みが広く行われるようになってきた。先行しているリンパ節および骨髄での微小癌細胞

検出に関してはその臨床的意義が定まりつつある^{8,9)}が, 血中癌細胞検出の検討は始まって間もなく, その評価は定まっていない。癌の転移は非効率的な過程であり, 動物モデルを用いた実験では静注した癌細胞の大部分は死滅し, 1%以下の細胞しか転移として成立しないことが知られている¹⁰⁾ したがって, 血液中に遊離癌細胞が証明されることは, すぐに転移を意味するものではないが, 少なくとも癌転移の過程における原発巣からの遊離と血管内侵入を果たした進行状況を示すと考えられる。

泌尿器科領域では前立腺癌において PSA や PSMA を指標とする RT-PCR 法の報告が多くみられる^{2,11)}が, 腎細胞癌に関しては特異的な腫瘍マーカーもなく, 患者の予後を予測する方法は限られている。われわれは, 上皮細胞に特異性の高い cytoke-ratin-19 (CK19) に着目し, 腎細胞癌患者血液中の CK19 mRNA を検出することを試みた。cytokeratin はおもに上皮細胞に存在する中間径フィラメントで, 現在約20種類の subunit が確認されている。CK19 を用いた末梢血中癌細胞の検出は, 乳癌³⁾, 肺癌^{12,13)}, 胃癌¹⁴⁾, 大腸癌¹⁵⁾などで既に行われており, 最もよく検討されているマーカーの1つといえる。Traweck¹⁶⁾ らは RT-PCR 法を用いて CK19 が正常人の末梢血, 骨髄, リンパ節では検出されなかったと述べているが, nested RT-PCR 法のような高感度な検出法を用いた場合は血液細胞中での弱い発現も検出して false positive の原因となることが報告されている。われわれと同じ primer を用いた非担癌者末梢血での CK19 mRNA 陽性率は, Datta ら³⁾によると39例中1例 (2.5%), Krismann ら¹²⁾によると65例中25例 (38%), Peck ら¹³⁾によると62例中1例 (1.6%) と報告者によりかなり差がみられる。

これらの false positive が生ずる原因として, Peck ら¹³⁾は血液採取時の皮膚上皮細胞混入が最も影響していることを指摘している。また, いくつかの CK19 mRNA の pseudogene 検出¹⁷⁻¹⁹⁾も問題視されている。本研究で用いた primer は, Bader ら¹⁷⁾や Savtchenko ら¹⁸⁾が見出した pseudogene と CK19 mRNA を区別しうる³⁾ Ruud ら¹⁹⁾は total RNA 抽出時の DNA 混入を原因とした pseudogene を見出し, DNase 処理を行った正常人の末梢血からはその pseudogene が検出されなかったが, assay の感度を最大とすると DNase 処理後でも検出される可能性があることを述べている。本法はあくまでも血液中における CK19 mRNA の相対的な発現の差を利用したものであり, 正常と癌とを効率的に区別できる PCR の至適増幅レベルを設定することが必要と考えられる。検出感度と特異性の改善のため, Peck ら¹³⁾は annealing の温度を 67°C (同じ primer を用いた以前の報

告は 72°C^{3,12)} にすることが有用であると述べている。われわれの方法では、採血時に3管目以後の検体を用い、total RNA 抽出後に RNase-free DNase 1 で処理し、annealing を 63°C で行った結果、正常人19例中2例(9%)が false positive を示し、末梢血単核細胞 1×10⁷ 個当たり OSRC-2 細胞10個で検出可能という感度であった。

尿路性器癌に対する末梢血中 CK19 mRNA の検出に関しては金田ら²⁰⁾も注目しており、6例の腎細胞癌患者中3例に検出されたことを報告しているが、臨床的な有用性についてはまだ明らかでない。現時点においてはわれわれの症例数も十分ではないが、臨床病期や遠隔転移と CK19 mRNA 発現の有無との間には有意な関連が認められている。また、CK19 mRNA 陽性例9例のうち4例(44%)は癌の進展を示しており、陰性例10例に再発所見を認めていないことから、今後の予後との関係が注目される。今回の検討では、末梢血と腎静脈血における検体採取部位による差は認められず、腎細胞癌の静脈内進展との間にも有意な関連は認めなかった。これらは、尿管浸潤の状態や癌細胞の接着などとも関連すると考えられることから、さらなる検討が必要と思われる。

最近、尿中の cytokeratin-20 mRNA を標的とした RT-PCR 法により膀胱癌診断の良好な結果²¹⁾が報告されており、泌尿器科領域においても cytokeratin を用いた微小癌診断の研究が今後さらに発展するものと思われる。

結 語

腎細胞癌患者の血液中 CK19 mRNA を nested primer RT-PCR 法により検出する方法は、false positive が約10%で臨床病期、遠隔転移と有意な関係が認められた。予後との関係は未だ不明であり、現時点ではすぐに臨床的判断に用いられるものとはいえないが、本法は腎細胞癌患者における血行性微小転移を早期に診断する有力な手段となる可能性があり、癌転移進行状況を示す新たな指標となりえると考えられた。

謝辞：本研究に御指導、御協力頂きました愛知県がんセンター研究所第一病理部の立松正衛部長、中西速夫室長に深謝致します。

文 献

- 1) Kunter U, Buer J, Probst M, et al.: Peripheral blood tyrosinase messenger RNA detection and survival in malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* **88**: 590-594, 1996
- 2) Israeli RS, Miller WH, Su SL, et al.: Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostatic-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* **54**: 6306-6310, 1994
- 3) Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, et al.: Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* **12**: 475-482, 1994
- 4) 腎癌取扱い規約(第2版). 日本泌尿器科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編, 金原出版, 東京, 1994
- 5) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159, 1987
- 6) Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, et al.: Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancer. *Cancer Res* **47**: 5616-5619, 1987
- 7) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467, 1977
- 8) Raj GV, Moreno JG and Gomella LG: Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* **82**: 1419-1442, 1998
- 9) Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL, et al.: Clinical significance of bone marrow metastasis as detected using the polymerase chain reaction in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* **14**: 1868-1876, 1996
- 10) Kobayashi K, Nakanishi H, Inada K, ed al.: Growth characteristics in the initial stage of micrometastasis formation by bacterial lacZ gene-tagged rat prostatic adenocarcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* **87**: 1227-1234, 1996
- 11) Ferrari AC, Stone NN, Eyler JN, et al.: Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1498-1504, 1997
- 12) Krismann M, Todt B, Schroder J, et al.: Low specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis for detection of hematogenous lung cancer dissemination. *J Clin Oncol* **13**: 2769-2775, 1995
- 13) Peck K, Sher YP, Shih JY, et al.: Detection and quantitation of circulating cancer cells in peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* **58**: 2761-2765, 1998
- 14) Yeh KH, Chen YC, Yeh SH, et al.: Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19)-possible clinical significance in advanced gastric cancer. *Anticancer Res* **18**: 1283-1286, 1998

- 15) Nakamori S, Kameyama M, Furukawa H, et al.: Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis Colon Rectum* **40**(suppl): s29-s36, 1997
- 16) Traweck ST, Liu J and Battifora H: Keratin gene expression in non-epithelial tissue: detection with polymerase chain reaction. *Am J Pathol* **142**: 1111-1118, 1993
- 17) Bader BL, Magin TM, Hatzfeld M, et al.: Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *EMBO J* **5**: 1865-1875, 1986
- 18) Savtchenko ES, Schiff TA, Jiang CK, et al.: Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence. *Am J Hum Genet* **43**: 630-637, 1988
- 19) Ruud P, Fodstad O and Hovig E: Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* **80**: 119-125, 1999
- 20) 金田隆志, 星 宣次, 毛 厚平, ほか: 尿路性器悪性腫瘍例における末梢血ケラチン 19mRNA の検出. *日泌尿会誌* **89**: 33-42, 1998
- 21) Buchumensky V, Klein A, Zemer R, et al.: Cytokeratin 20: a new marker for early detection of bladder cell carcinoma. *J Urol* **160**: 1971-1974, 1998

(Received on May 25, 1999)
(Accepted on June 1, 1999)